

正常菌群对常见致病菌拮抗作用的研究

熊德鑫

(解放军三〇四医院, 北京 100037)

摘要 生物拮抗作用是微生物种群关系研究的一个侧面, 实验中我们使用从皮肤上分离的常住菌座疮丙酸杆菌 (A14-1) 和表皮葡萄球菌 (F65) 对常见致病菌如金黄色葡萄球菌 (C189)、绿脓杆菌 (C8514) 和埃希氏大肠杆菌 (C1356) 的体外拮抗试验表明, 它们具有明显的拮抗作用, 拮抗作用一般从 48 小时开始, 72 小时明显。而皮肤常住菌间无拮抗作用, 相反它们还有协同作用, 这对于皮肤的自净以及维持皮肤的微生态平衡具有重要的作用。此外, 实验中还进行了乳杆菌和双歧杆菌等正常菌群分离株与上述常见致病菌的体外拮抗试验, 结果表明也有一定的拮抗作用, 对宿主的保健有一定的意义。

关键词 正常菌群; 致病菌; 生物拮抗

微生物种群间关系相当复杂, 既包括正相互关系, 如协同 (Synergism) 关系, 也包括负相互关系, 如竞争 (Competition)⁽¹⁾ 或拮抗 (antagonist)。我们从健康人皮肤上分离的正常菌

群, 经驯化、筛选、分类和鉴定以及动物毒性试验研究后, 进一步研究它们对皮肤上常见的致病菌的拮抗作用, 以了解分离菌株的生理作用即生态效应。

生物拮抗作用的研究是微生物种群间关系的一个侧面。微生物种群的生物拮抗作用,是维持微生态平衡所必须的。就皮肤菌群来说,常住菌如痤疮丙酸杆菌和表皮葡萄球菌能够拮抗常见致病菌如金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌等,构成皮肤的生物屏障,预防或减少感染性疾病,有益于皮肤健康,是皮肤保健重要因素之一。

材料和方法

(一) 材料

1. 正常菌群分离菌株: F65 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、A14-1 痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*)、ad3 干酪乳杆菌 (*Lactobacterium casei*) 和青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*)。

2. 常见致病菌: 由中国科学院微生物研究所引进的菌株: C189 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、C1365 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和 C8514 绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。

3. 培养基⁽²⁾: 胰蛋白胨、酵母粉、肝浸膏粉和葡萄糖培养基即 GAM 培养基。胰酶水解物、酵母粉、吐温-80 及半胱氨酸培养基即 MAR 培养基。

(二) 方法

1. 浓菌液的制备: 分离和引进菌株 48 小时培养物, 制备成 10 亿/ml 浓菌液。

2. 培养方式: 分单一和两两混合培养两种。单一培养, 将浓菌液 1ml 加入装有 99ml 含甘油三酸脂 (1%, V/V) 的 GAM 或 MAR 液体培养基的三角瓶中。两两混合培养是将分离和引进菌株的浓菌液各取 1ml 加入装有 198ml GAM 或 MAR 液体培养基中, 37℃ 普通培养箱培养。隔 24 小时添加 GAM (或 MAR) 浓缩培养基 (10 倍浓缩, pH7.3—7.4) 20ml 一次。

3. 平板活菌计数: 24、48、72、96 小时或一周后, 各取 0.1ml 滴入 GAM 血平板培养基上, 用灭菌 L 玻棒散开, 一式两块, 一块置 37℃ 需氧培养, 一块置 Gas-pak 罐中厌氧培养, 24 或

48 小时后分别计数和鉴定。

结 果

1. 正常菌群分离株 A14-1 单一培养, 及与引进株 C189、C8514、C1365 两两混合培养, 结果见表 1。

表 1 A14-1 菌株拮抗试验结果

菌 株	方 法	37℃ 深层液体培养时间 (h)			
		24	48	72	96
A14-1	单独培养	8.00*	8.62	8.20	7.10
C189		8.60	9.00	8.30	7.90
C1365		8.80	9.10	8.20	7.60
C8514		8.00	9.20	8.30	7.30
A14-1	混合培养	8.20	8.70	8.18	7.30
C189		8.00	8.23	7.60	5.00
A14-1	混合培养	8.40	7.50	7.30	7.10
C1365		8.00	8.40	6.90	6.00
A14-1	混合培养	8.41	9.00	7.58	7.40
C8514		8.40	8.20	7.50	5.80

* 为平板活菌计数的 Log₁₀ 值

2. 正常菌群分离株 F65 单一培养, 及与引进株 C189、C1365、C8514 菌株两两混合培养, 结果见表 2。

表 2 F65 菌株拮抗试验结果

菌 株	方 法	37℃ 深层液体培养时间 (h)			
		24	48	72	96
F65	单独培养	8.00*	8.19	7.80	7.10
C189		8.50	8.80	7.40	7.00
C1365		8.70	9.20	8.40	7.60
C8514		8.10	8.40	7.90	7.20
F65	混合培养	7.80	8.16	7.30	6.30
C189		7.96	6.70	5.85	5.00
F65	混合培养	7.60	8.35	7.90	7.40
C1365		7.85	8.00	7.30	5.10
F65	混合培养	8.00	7.53	7.00	6.40
C8514		7.00	8.30	5.30	4.10

* 为平板活菌计数的 Log₁₀ 值

3. 正常菌群分离株 ad3 单一及与引进株 C189、C1365、C8514 两两混合培养, 结果见表 3。

表 3 ad3 菌株拮抗试验结果

菌 株	方 法	37℃ 深层液体培养时间(h)			
		24	48	72	96
ad3	单独培养	7.88*	8.48	7.93	7.00
C189		8.10	9.00	8.20	7.30
C1365		8.40	9.10	8.00	7.60
C8514		8.00	8.80	7.90	7.00
ad3	混合培养	7.48	8.80	7.90	7.30
C189		8.00	8.30	7.20	6.30
ad3	混合培养	7.88	8.48	7.93	7.10
C1365		8.30	8.10	7.48	5.10
ad3	混合培养	7.90	8.80	7.94	7.00
C8514		7.80	8.10	6.35	4.20

* 为平板活菌计数的 Log10 值

4. 正常菌群分离株 Bf1 单一, 及与引进株 C189、C1365、C8514 两两混合培养, 结果见表 4。

表 4 Bf1 菌株拮抗试验结果

菌 株	方 法	37℃ 深层液体培养时间(h)			
		24	48	72	96
Bf1	单独培养	8.10*	8.60	7.80	7.10
C189		8.00	8.80	7.90	7.20
C1365		8.60	9.00	8.30	7.40
C8514		8.20	9.10	8.40	7.30
Bf1	混合培养	7.80	8.40	7.60	5.90
C189		7.70	6.70	5.00	4.10
Bf1	混合培养	8.00	8.60	7.60	6.10
C1365		7.80	7.20	6.30	5.10
Bf1	混合培养	7.90	8.40	7.60	6.60
C8514		7.90	7.00	5.80	4.00

* 为平板活菌计数的 Log10 值

5. 正常菌群分离株 A14-1 与 F65 单一和混合培养, 结果见表 5。

表 5 A14-1 与 F65 菌株混合培养结果

菌 株	方 法	37℃ 深层液体培养时间(h)			
		24	48	72	96
A14-1	单独培养	8.20*	9.10	8.30	7.80
F65		8.00	7.90	7.20	6.90
A14-1	混合培养	7.80	8.40	7.68	7.10
F65		7.70	8.00	7.00	6.80

* 为平板活菌计数的 Log10 值

讨 论

我们对皮肤微生态系菌际关系即皮肤菌群种群间相互关系进行了初步的研究。从表 1 中可知, 从健康人皮肤上分离的痤疮丙酸杆菌 A14-1 株, 对皮肤感染常见的致病菌: 金黄色葡萄球菌 C189 株、埃希氏大肠杆菌 C1365 株和绿脓杆菌 C8514 株有拮抗作用, 拮抗作用自 48 小时始, 至 96 小时显著。有报告指出^[3], 这种拮抗作用的机理之一是将皮脂腺分泌的甘油三酸酯等脂质分解或游离脂肪酸(如乙酸、乳酸), 我们在后来的气相色谱分析中证实了这一点(此文另报), 这些游离脂肪酸对金黄色葡萄球菌有明显的抑制作用。而皮肤正常菌另一分离株表皮葡萄球菌 F65 株与金黄色葡萄球菌, 从混合培养就开始出现抑制作用, 48 小时显著; 对大肠杆菌和绿脓杆菌 48 小时后出现抑制作用, 72 小时显著。有报告认为^[4,5]表皮葡萄球菌这种种间的生物拮抗作用, 可能与其分泌的溶菌酶作用有关。

另外, 正常菌群的另外 2 个分离菌株: ad3 干酪乳杆菌和 Bf1 青春双歧杆菌, 对金黄色葡萄球菌 C189 株、大肠杆菌 C1365 及绿脓杆菌 C8514 株也有拮抗作用。这种拮抗作用一般在混合培养 72 小时后出现, 96 小时显著, 提示, 可能其拮抗作用的机理与它们的酸性代谢形成, 及营养争夺等有关。

A14-1 痤疮丙酸杆菌和 F65 株表皮葡萄球菌进行了混合培养, 48 至 96 小时, 与其单一培养生长曲线呈平行关系, 说明无拮抗作用。在测定单一与混合培养液的 96 小时 pH 值时, 发现混合培养比单一培养低, 差异显著。但活菌数的减少, 混合培养与单一培养差异并不显著, 说明它们之间的协同或共生关系。有报告认为^[1], 皮肤常住菌痤疮丙酸杆菌和表皮葡萄球菌能协同地分解皮肤表面的脂类物质, 形成酸罩, 构成化学和生物屏障, 对皮肤微生态平衡起重要作用。

参 考 文 献

1. 康白主编: 微生物学, 大连出版社, P. 58, 1988。
2. 熊德鑫译著: 厌氧菌的分离和鉴定方法, 江西科技出版社, P. 82, 1986。
3. Noble W C; *J. Med. Microbiol.*, **17**: 1-2, 1984。
4. Charles A E; *J. Investi. Dermatology*, **34**: 42-46, 1975。
5. Kloos W E et al.; *App. Microbi.*, **30**: 381-395, 1975。
6. Noble W C et al.; *Microbiology of Human Skin*, 2nd ed London, Lody luke CO, p. 7-63, 1981。
7. 魏曦、康白编著: 正常菌群与健康, 上海科技出版社, P. 37-39, 1985。

(1991-10-09 收稿)

STUDIES ON ANTAGONISTIC INTERACTION OF HUMAN SKIN NORMAL FLORA AND COMMON PATHOGENIC BACTERIA

Xiong Dexin

(The 304 Hospital of PLA, Beijing 100037)

Biological antagonism was found to be only one aspect When we Study the interactions among the microbial populations in and on the human beings. We examined the following strains of the resident flora isolated from the human healthy skin, including propionibacterium acnes (A14-1), Staphylococcus epidermidis (F65), and a number of the common dermal pathogenic micro-organisms such as staphylococcus aureus, Ps. aeruginosa and E. coli, for their antagonistic interactions in vitro. The following results were obtained, they revealed obvious antagonism After 48h of contact in vitro antagonistic interaction to appear, and after 72h antagonism displayed obviously. On the other hand, P. acnes (A14-1) and S. epidermidis (F65) showed no antagonism, they behaved commensally, such commensality seemed to be important for the autoperification of the human normal skin surfaces resulting in dermal microeubiosis of the human beings.

We examined the members of the transient microbial flora of the healthy human skin Lactobacterium (ad3), Bifidobacterium (Bf1) and some common pathogenic bacteria in antagonistic experiments in vitro, and discovered that they showed micropopulations appeared to be of great value to the maintenance of good health to their host.

Key words Normal Flora; Pathogenic bacteria; Biological antagonism